

PCT/EP 99/06453 Ret

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP 99/06453

09/786011



REC'D 23 DEC 1999  
WIPO PCT

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**Bescheinigung**

Die Biotecon Gesellschaft für Biotechnologische Entwicklung und Consulting mbH  
in Berlin/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Oligonukleotide, Verfahren und Kit zur Detektion von *Listeria*  
monocytogenes durch Nukleinsäureamplifikation und/oder  
-hybridisierung"

am 2. September 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-  
lichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

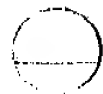
Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole  
C 07 H und C 12 Q der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 3. November 1999  
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

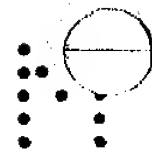
Hoiß



**BOETERS & BAUER**

PATENTANWÄLTE  
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS  
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS

BEREITERANGER 15  
D-81541 MÜNCHEN



DIPL.-CHEM. DR. HANS D. BOETERS  
DIPL.-ING. ROBERT BAUER  
DIPL.-CHEM. DR. DIETMAR G. FORSTMAYER

TELEFON: (089) 65 00 86  
TELEFAX: (089) 65 39 62  
E-MAIL: patents@t-online.de

PAe BOETERS & BAUER  
BEREITERANGER 15, D-81541 MÜNCHEN

1. September 1998

Unser Zeichen: 9545

BIOTECON Gesellschaft für Biotechnologische  
Entwicklung und Consulting mbH

**Oligonukleotide, Verfahren und Kit zur Detektion von *Listeria  
monocytogenes* durch Nukleinsäureamplifikation und/oder -hybri-  
disierung**

Erfindungsgemäß werden Oligonukleotide, Verfahren und Kit zur  
Detektion von *Listeria monocytogenes* durch Nukleinsäureamplifi-  
kation und/oder -hybridisierung bereitgestellt.

Die Gattung *Listeria* besteht aus den sechs Spezies *L. monocyto-  
genes*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seligeri* und *L.  
welshimeri*. Unter diesen sind nur Stämme der Spezies *L. mono-  
cytogenes* pathogen für den Menschen, insbesondere für Immunge-  
schwächte, Ältere und Neugeborene. Die häufigsten Symptome der  
Listeriose sind Septikämie, Meningitis und Fehlgeburten. Infek-  
tionen durch *L. monocytogenes* werden vor allem durch die Auf-  
nahme kontaminierter Lebensmittel verursacht, insbesondere von  
Milchprodukten, Fleisch, Geflügel und Gemüse.

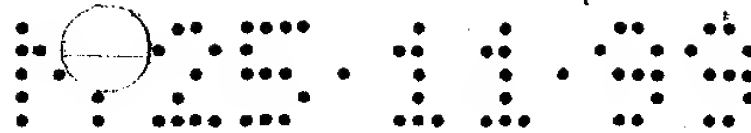
Eine Vielzahl von Verfahren zur Detektion von *L. monocytogenes*  
sind bekannt. Konventionelle Detektionsverfahren für *L. mono-*

9.25.11.99

cytogenes bestehen aus einer Voranreicherung und nachfolgender Isolation von Kolonien auf Selektivmedien (Lovett et al., J. Food Protection 50 (1987), 188-192; McClain & Lee, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71 (1988), 660-664). Einzelkolonien werden nach ihrer Morphologie bzw. nach biochemischen oder serologischen Eigenschaften untersucht. Die Durchführung einer Analyse kann bis zu 6 - 8 Tagen in Anspruch nehmen.

Da vor allem leicht verderbliche Nahrungsmittel häufig mit *L. monocytogenes* kontaminiert sind, wurden verschiedene Schnellverfahren zur Detektion von *L. monocytogenes* entwickelt. Diese Verfahren basieren entweder auf immunologischen Methoden oder der Anwendung von Nukleinsäuresonden.

Dabei kann die Detektion durch direkte Hybridisierung von Sonden an keimspezifische DNA bzw. RNA erfolgen (siehe z.B. Datta, A. R. et al., Appl. Environ. Microbiol. 53 (1987), 2256-2259). Der Nachteil bei solchen Verfahren ist die geringe Sensitivität, da mindestens  $10^5$ - $10^6$  Kopien der Zielnukleinsäure erforderlich sind. Dies kann durch Kombination mit einer Vervielfältigung der Zielsequenz, z.B. durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), ausgeglichen werden. Mehrere PCR-Verfahren zum Nachweis von *L. monocytogenes* sind in der Literatur beschrieben [zur Übersicht siehe z.B. Jones, D.D. & Bej, A.K. in "PCR Technology, Current Innovations", Griffin, H.G. & Griffin, A.M., Hrsg., (1994), 341-365]. Siehe auch die US Patente 4,683,195; 4,683,202 und 4,965,188. Ferner können die Ligase-Kettenreaktion [WO Veröffentlichung 89/09835], die „self-sustained sequence replication“ [EP 329,822], das „transcription based amplification system“ [EP 310,229] und das Q $\beta$  RNA-Replikase-System [US Patent 4,957,858] zur Amplifikation von Nukleinsäuren eingesetzt werden.



Es sind auch bereits einige Testkits zur Detektion mittels Antikörpern kommerziell erhältlich. Die meisten dieser Tests zeigen jedoch nur eine geringe Sensitivität und Spezifität.

Zur Detektion von spezifischen Mikroorganismen mittels Nukleinsäure-Hybridisierung oder -Amplifikation werden üblicherweise keimspezifische Oligonukleotide verwendet, deren Basensequenz für die DNA oder RNA eines spezifischen Mikroorganismus oder einer Gruppe von Mikroorganismen charakteristisch ist. Eine Hybridisierung an die DNA/RNA bzw. eine Amplifikation von DNA/RNA bei Einsatz dieser keimspezifischen Oligonukleotide (z.B. als Primer oder Sonden) mit den oben genannten Verfahren kann, unter geeigneten Reaktionsbedingungen, nur dann erfolgen, wenn die DNA/RNA der jeweils nachzuweisenden Mikroorganismen anwesend ist.

Die für *L. monocytogenes* beschriebenen Nachweisverfahren basieren überwiegend auf solchen Zielgenen, die eine Rolle in der Pathogenität von *L. monocytogenes* spielen. Es ist bekannt, daß einige dieser Gene in einem Virulenz-Gencluster benachbart auf dem Chromosom angeordnet sind. Da das Listeriolysin-Gen (*hlyA*) zuerst als eindeutig notwendig für die Pathogenität von *L. monocytogenes* erkannt wurde (Cossart, P. et al., Infect. Immun. 57 (1989), 3629-3636), basieren die meisten genotypischen Nachweisverfahren auf diesem Gen. Das *hlyA*-Gen kommt jedoch mit hoher Homologie auch bei apathogenen Listerien vor (i.e. bei *L. seeligeri* und *L. ivanovii*). Das Auftreten von falsch-positiven Ergebnissen ist bei diesen Nachweisverfahren nicht mit vollständiger Sicherheit auszuschließen, da einzelne Punktmutationen im Bereich der Bindungsstellen von Primern oder Sonden hierzu bereits ausreichen können.

Für das dem *hlyA*-Gen im Genom direkt benachbarte Metalloprotease-Gen (*mpl*), konnte gezeigt werden, daß es nur bei *L. mono-*

*cytogenes* vorkommt, also nicht bei apathogenen Listerien (Dommann, E. et al., Infect. Immun. 59 (1991), 65-72).

Die prinzipielle Eignung der das *hlyA*-Gen flankierenden DNA-Region zum Nachweis von *L. monocytogenes* mittels Hybridisierung oder Amplifikation ist beschrieben (Rossen, L. et al., Int. J. Food Microbiol. 14 (1991), 145-152), jedoch sind bisher für solche Nachweisverfahren keine Oligonukleotidsequenzen publiziert worden.

Die Sequenz des *mpl*-Gens von *L. monocytogenes* ist in der EMBL Datenbank unter der Accession Nummer X54619 beschrieben [Dommann, E. et al., Infect. Immun. 59 (1991), 65-72]. Desweiteren sind Teile der Sequenz des *mpl*-Gens von *L. monocytogenes* in der EMBL Datenbank unter der Accession Nummer X60035 aufgeführt [Rasmussen, O. F. et al., Infect. Immun. 59 (1991), 3945-3951].

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es nun, ein routinegeeignetes Nachweisverfahren zu entwickeln, bei dem auch unter stark schwankenden Versuchsbedingungen beim jeweiligen Anwender die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten falsch-positiver Ergebnisse möglichst gering ist.

Insbesondere sollen Oligonukleotidsequenzen bereitgestellt werden, die in einem Nachweisverfahren für das Metallprotease-Gen (*mpl*) von *L. monocytogenes* eingesetzt werden können.

Diese Aufgaben werden durch die Bereitstellung von Nukleinsäuremolekülen der Sequenzen

- (i) 5'-GAA AAA GCA TTT GAA GCC AT-3' oder
- (ii) 5'-GCA ACT TCC GGC TCA GC-3' oder
- (iii) 5'-TCG AAA AAG CAT TTG AAG CC-3' oder
- (iv) 5'-GGT CAG AGT GAA GCT CAT GT-3' oder

- (v) von zu (i), (ii), (iii) und (iv) jeweils komplementären Sequenzen gelöst.

Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide können wie folgt definiert sein:

Oligonukleotid LM1: (Sequenz (i) = SEQ ID NO 1 entspricht der Position 2476 bis 2495 von *L. monocytogenes* [nach Domann, E. et al. Infect. Immun. 59 (1991), 65-72].

Oligonukleotid LM 2: (Sequenz (ii) = SEQ ID NO 2) entspricht der Position 2608 bis 2624 von *L. monocytogenes*.

Oligonukleotid LM 3: (Sequenz (iii) = SEQ ID NO 3) entspricht der Position 2474 bis 2493 von *L. monocytogenes*.

Oligonukleotid LM 4 (Sequenz (iv) = SEQ ID NO 4) entspricht der Position 2497 bis 2516 von *L. monocytogenes*.

Zur Untersuchung, inwieweit Sequenzvariationen des *mpl*-Gens innerhalb der Spezies *L. monocytogenes* auftreten, wurde ein internes Fragment von 300 Basenpaaren von 13 *L. monocytogenes* Stämmen verschiedener Serovare (2 Stämme der Serovare 1/2a, 1 Stamm des Serovars 1/2b, 1 Stamm des Serovars 1/2c, 1 Stamm des Serovars 3a, 1 Stamm des Serovars 3b, 1 Stamm des Serovars 3c, 1 Stamm des Serovars 4a, 1 Stamm des Serovars 4a/b, 1 Stamm des Serovars 4b, 1 Stamm des Serovars 4c, 1 Stamm des Serovars 4d und 1 Stamm des Serovars 7) sequenziert. Anhand der Sequenzvergleiche wurde überraschenderweise gefunden, daß die Oligonukleotide LM1, LM 2, LM3, LM 4 sowie dazu komplementäre Sequenzen in Nachweisverfahren für *L. monocytogenes* zu hochspezifischen Nachweisen führen. Dabei wird das Oligonukleotid LM4 bzw. die dazu komplementäre Sequenz vorzugsweise als Sonde verwendet.

Erfindungsgemäß werden insbesondere Nukleinsäuremoleküle bereitgestellt, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie

bezüglich mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden ihrer Nukleotidkette

- (a) mit 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der vorstehenden Nukleinsäuremoleküle (i) bis (v) identisch sind oder
- (b) mit 9 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der vorstehenden Nukleinsäuremoleküle (i) bis (v) übereinstimmen oder
- (c) mit 8 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der vorstehenden Nukleinsäuremoleküle (i) bis (v) übereinstimmen oder
- (d) zu mindestens 90 % mit einem Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 homolog sind.

Die keimspezifischen Oligonukleotide sind insbesondere Nukleinsäuren, die 10 bis 250 Basen (vorzugsweise 15 bis 30 Basen) lang sind.

Sie können einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegen.

Geeignet als erfindungsgemäße keimspezifische Oligonukleotide zum Nachweis von *L. monocytogenes* sind also Nukleinsäuren, vorzugsweise 10 bis 250 Basen und insbesondere 15 bis 30 Basen lang, die mindestens in einer 10 Basen langen Sequenz mit den angegebenen Sequenzen LM 1 bis 4 oder den hierzu komplementären Sequenzen übereinstimmen. Geringere Abweichungen (1 bis 2 Basen) in dieser 10 Basen langen Sequenz sind möglich, ohne daß die jeweils angegebene Spezifität bei der Amplifikation und/oder Hybridisierung verloren geht. Dem Fachmann ist bekannt, daß im Falle solcher geringeren Abweichungen die Reaktionsbedingungen entsprechend verändert werden müssen; vgl. beispielsweise T. Maniatis, Molecular Cloning, Herausgeber G. Sam-

brook & E.F. Fritsch, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

Zum Nachweis von *L. monocytogenes* werden Nukleinsäuren, vorzugsweise genomische DNA, zunächst aus den in einer zu untersuchenden Probe bzw. Bakterienkultur enthaltenen Zellen freigesetzt. Mittels Nukleinsäure-Hybridisierung kann dann, und zwar unter Einsatz der erfindungsgemäßen keimspezifischen Oligonukleotide als Sonde, der direkte Nachweis von keimspezifischen Nukleinsäuresequenzen in der zu untersuchenden Probe erfolgen. Geeignet hierzu sind verschiedene dem Fachmann bekannte Verfahren, wie z.B. "Southern blot" oder "dot blot".

Bevorzugt ist jedoch, vor allem wegen der höheren Empfindlichkeit, ein indirektes Nachweisverfahren, bei dem die gesuchten und wie vorstehend beschriebenen freigesetzten DNA/RNA-Sequenzen zunächst mittels der o.g. Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren, vorzugsweise PCR, amplifiziert werden.

Die Amplifikation von DNA/RNA unter Verwendung der genannten Verfahren erfolgt unter Einsatz der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle als Primer. Dabei werden nur in dem Fall spezifische Amplifikate gebildet, in dem DNA/RNA von *L. monocytogenes* anwesend ist. Durch eine nachgeschaltete Detektionsreaktion unter Verwendung von der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle als Sonden kann die Spezifität des Nachweisverfahrens erhöht werden. Für diese nachgeschaltete Detektionsreaktion ist ebenso die Verwendung von nicht vollständig keimspezifischen Oligonukleotiden möglich.

Alternativ kann die Nukleinsäure-Amplifikation auch in Anwesenheit eines oder mehrerer nicht vollständig spezifischer Oligonukleotide durchgeführt werden, so daß möglicherweise auch DNA/RNA anderer, nicht-nachzuweisender Mikroorganismen amplifiziert werden kann. Ein derartiges Amplifikations-





verfahren ist in der Regel weniger spezifisch und sollte daher durch eine nachfolgende Detektionsreaktion mit einem oder mehreren der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül(e) als Sonde(n) abgesichert werden.

Erfindungsgemäß können verschiedene Verfahren eingesetzt werden, um die bei den indirekten Verfahren entstehenden Amplifikationsprodukte nachzuweisen. Dazu gehören u.a. an sich bekannte Verfahren wie die Visualisierung mittels Gelelektrophorese, die Hybridisierung von Sonden an immobilisierte Reaktionsprodukte [gekoppelt an Nylon- oder Nitrocellulose-Filter ("Southern blots") oder z.B. an "beads" oder Mikrotiterplatten] und die Hybridisierung der Reaktionsprodukte an immobilisierte Sonden (z.B. "reverse dot blots" oder mit Sonden gekoppelte "beads" oder Mikrotiterplatten).

Erfindungsgemäß können eine Vielzahl verschiedener an sich bekannter Varianten eingesetzt werden, mit denen die erfindungsgemäßen Oligonukleotide (z.B. Sonden und Primer) für die beschriebenen direkten oder indirekten Nachweisverfahren markiert bzw. modifiziert werden können. So können diese beispielsweise radioaktive, farbige, fluoreszierende oder anderweitig modifizierte bzw. modifizierende Gruppen enthalten, beispielsweise Antikörper, Antigene, Enzyme bzw. andere Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen. Sonden bzw. Primer können entweder natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte doppelsträngige oder einzelsträngige DNA oder RNA bzw. modifizierte Formen von DNA oder RNA, wie z.B. PNA sein (bei diesen Molekülen sind die Zucker-Einheiten durch Aminosäuren oder Peptide ausgetauscht). Einzelne oder mehrere Nukleotide der erfindungsgemäßen Sonden oder Primer können gegen analoge Bausteine (wie z.B. Nukleotide, die in der Ziel-Nukleinsäure nicht natürlich vorkommen) ersetzt sein.

Insbesondere können bis zu 20 % von mindestens 10

aufeinanderfolgenden Nukleotiden einer Nukleotidkette, insbesondere 1 oder 2 Nukleotide, durch für Sonden und/oder Primer an sich bekannte analoge Bausteine ersetzt werden.

Bei den o.g. indirekten Nachweisverfahren kann Detektion auch über ein intern-markiertes Amplifikat geführt werden. Dies kann z.B. über den Einbau von modifizierten (z.B. an Digoxigenin oder an Fluorescein gekoppelten) Nukleosidtriphosphaten während der Amplifikationsreaktion erfolgen.

Weiter wird erfindungsgemäß ein Kit für analytische Nachweisverfahren, insbesondere zum Nachweis von Bakterien der Spezies *Listeria monocytogenes*, bereitgestellt, der ein oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuremoleküle enthält.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle bzw. die entsprechenden Kits können in einem Verfahren zum Nachweis der An- oder Abwesenheit von Bakterien der Spezies *L. monocytogenes* in einer Probe verwendet werden, wobei es sich bei dem Verfahren vorzugsweise um eine Nukleinsäurehybridisierung und/oder eine Nukleinsäureamplifikation, wie eine PCR, handelt. Dabei können nachzuweisende Bakterien von nicht-nachzuweisenden Bakterien anhand von Unterschieden der genomischen DNA und/oder RNA an mindestens einer Nukleotidposition im Bereich eines der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle unterschieden werden.

### Beispiel

**Beispiel 1:** Nachweis von Bakterien der Spezies *L. monocytogenes* mit der Polymerase-Kettenreaktion

Aus Reinkulturen der in Tabelle 1 aufgeführten Bakterien wurde DNA mittels Standardverfahren isoliert. Je ca. 10 bis 100 ng

19.05.11.99

dieser DNA-Präparationen wurde dann in Gegenwart von je 0,4 µM Oligonukleotid LM 1 und LM 2, oder LM 3 und LM 2, 200 µM dNTP's (Boehringer Mannheim), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris/HCl (pH 8,8), 0,01% Tween 20 und 0,03 U/µl Taq DNA Polymerase (Biomaster) in die PCR eingesetzt. Die PCR wurde in einem Perkin Elmer 9600 Thermocycler mit dem nachfolgend aufgeführten Thermoprofil durchgeführt:

Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
35 Zyklen	94 °C	30 sec
	57 °C	30 sec
	72 °C	30 sec
Finale Synthese	72 °C	5 min

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Amplifikationsprodukte mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Anfärbung mit Ethidiumbromid visualisiert. Die erwarteten Produkte von 149 bp bzw. 151 bp Länge wurden nur in den Fällen beobachtet, in denen DNA von Stämmen der Spezies *L. monocytogenes* anwesend war. Die in den Gelen aufgetrennte DNA wurde mittels Standard-Methoden auf Nylon Filter transferiert und zur Überprüfung der Spezifität mit dem am 5'-Ende Digoxigenin-markierten Oligonukleotid LM 4 (Sequenz 4) hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte in 5 x SSC, 2 % Blocking Reagenz, 0,1 % Laurylsarcosin, 0,02 % SDS und 5 pmol/ml Sonde für 4 h bei 60 °C. Gewaschen wurde in 2 x SSC, 0,1 % SDS für 2 x 10 min bei 60 °C. Die Detektion erfolgte nach Standard-Methoden mittels Alkalischer Phosphatase Konjugate (Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragment, Fa. Boehringer Mannheim) in Anwesenheit von 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat und 4-Nitro-Blue Tetrazoliumchlorid (Fa. Boehringer Mannheim).

Auf den Filtern wurde nur in den Fällen eine Bande beobachtet, in denen zuvor eine Bande von 149 bp bzw. 151 bp auf dem Agarosegel sichtbar war. Somit wurde mittels PCR und Hybridisierung die Anwesenheit sämtlicher 103 getesteten *L. monocytogenes* -

Stämme nachgewiesen. Hingegen wurde keiner der getesteten nicht zu dieser Spezies gehörenden Bakterienstämme mit diesem System erfaßt.

**Tabelle 1:** Resultate der PCR-Amplifikation mit den Oligonukleotiden LM 1 und LM 2 (SEQ ID NO 1 und SEQ ID NO 2) bzw. LM 3 und LM 2 (SEQ ID NO 3 und SEQ ID NO 2) und jeweils nachfolgender Hybridisierung mit dem Oligonukleotid LM4 (SEQ ID NO 4)

Spezies	Serovar	Stamm-bezeichnung	LM1/LM2	LM2/LM3
<i>Listeria welshimeri</i>		SLCC 767	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>		SLCC 768	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>		SLCC 5877	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>		SLCC 5828	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>		SLCC 6199	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>		DSM 20650	-	-
<i>Listeria seeligeri</i>		SLCC 5921	-	-
<i>Listeria seeligeri</i>		SLCC 7303	-	-
<i>Listeria seeligeri</i>		SLCC 7309	-	-
<i>Listeria seeligeri</i>		SLCC 7329	-	-
<i>Listeria seeligeri</i>		SLCC 3954	-	-
<i>Listeria seeligeri</i>		DSM 20751	-	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 5326	-	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 7160	-	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 7161	-	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 7167	-	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 7168	-	-
<i>Listeria innocua</i>		DSM 20649	-	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 3408	-	-
<i>Listeria innocua</i>		NCTC 10528	-	-
<i>Listeria innocua</i>		SLCC 7139	-	-
<i>Listeria grayi</i>		DSM 20601	-	-
<i>Listeria grayi</i>		DSM 20596	-	-
<i>Listeria grayi</i>		BC 7308	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		DSM 20750	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 2028	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 2098	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 2102	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 2379	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 4121	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 4706	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 4770	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		SLCC 5378	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>		ATCC 19119	-	-
<i>L. monocytogenes</i>		ATCC 19111	+	+
<i>L. monocytogenes</i>		ATCC 19112	+	+
<i>L. monocytogenes</i>		ATCC 19113	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>		ATCC 19114	+	n.d.

25.11.99

<i>L. monocytogenes</i>		ATCC 19115	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>		ATCC 19116	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>		ATCC 19117	+	+
<i>L. monocytogenes</i>		ATCC 19118	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>		SLCC 53	+	+
<i>L. monocytogenes</i>		SLCC 2479	+	+
<i>L. monocytogenes</i>		SLCC 2482	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>		SLCC 5835	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 4955	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 6204	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7149	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7150	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7153	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7165	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7195	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7196	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7197	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7198	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7973	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7053	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7054	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 a	SLCC 7055	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 6031	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7163	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7151	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7152	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7354	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7367	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 b	SLCC 7059	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 4950	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 6793	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 7154	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 7290	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 7352	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	1 / 2 c	SLCC 7355	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	3 a	SLCC 4949	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	3 a	SLCC 7135	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	3 a	SLCC 7179	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	3 b	SLCC 2540	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	3 b	SLCC 7140	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	3 b	SLCC 7381	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	3 c	SLCC 2471	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 a	SLCC 5069	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 a	SLCC 5070	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 a / b	SLCC 7083	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 a / b	SLCC 7065	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 a / b	SLCC 7069	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 4013	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7194	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7356	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7370	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7372	+	+

1951

<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7373	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7374	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 788	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7056	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7057	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7058	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7060	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7061	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7062	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7063	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7064	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7066	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7067	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7068	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7069	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7070	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7071	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7072	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7073	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7074	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7075	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7076	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7077	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7078	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7079	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7080	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7081	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7082	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7084	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7085	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7086	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7087	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7088	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7089	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7090	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7091	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 b	SLCC 7092	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 4925	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 4954	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 6277	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 6813	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 6821	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 c	SLCC 6823	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 d	SLCC 2375	+	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	4 d	SLCC 4926	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4 d	SLCC 4952	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	7	SLCC 2622	+	+
<i>Arthrobacter spec.</i>		DSM 312	-	n.d.
<i>Bacillus subtilis</i>		ATCC 6051	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>		DSM 30040	-	-
<i>Citrobacter koseri</i>		DSM 4595	-	n.d.
<i>Clostridium bifermentans</i>		DSM 630	-	n.d.

25.11.99

<i>Clostridium sporogenes</i>	IfGB 0303	-	n.d.
<i>Enterobacter agglomerans</i>	IfGB 0202	-	n.d.
<i>Enterobacter cloacae</i>	DSM 30054	-	-
<i>Enterobacter gergoviae</i>	BC 674	-	n.d.
<i>Erwinia carotovora</i>	DSM 30168	-	n.d.
<i>Escherichia coli</i>	DSM 30083	-	n.d.
<i>Hafnia alvei</i>	IfGB 0101	-	n.d.
<i>Klebsiella oxytoca</i>	DSM 5175	-	n.d.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSM 2026	-	n.d.
<i>Lactobacillus spec.</i>	IfGB 1401	-	n.d.
<i>Lactob. bif fermentans</i>	BC 8463	-	-
<i>Leuconostoc carnosum</i>	DSM 5576	-	n.d.
<i>Leucon. mesenteroides</i>	DSM 2146	-	n.d.
<i>Micrococcus citreus</i>	IfGB 0601	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	DSM 348	-	-
<i>Pediococcus damnosus</i>	BC 505	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	IfGB 51	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	DSM 2041	-	n.d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145	-	n.d.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	IfGB 0301	-	-
<i>Salmonella spec.</i>	BC 2426	-	n.d.
<i>Salmonella typhimurium</i>	BC 2157	-	n.d.
<i>Serratia marcescens</i>	BC 677	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	DSM 4782	-	n.d.
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	-	-
<i>Streptococcus faecalis</i>	DSM 20380	-	n.d.
<i>Strept. faecalis</i>	DSM 20478	-	n.d.
<i>Strept. diacetylactis</i>	BC 2149	-	-
<i>Strept. thermophilus</i>	DSM 20259	-	n.d.
<i>Yersinia enterocolitica</i>	DSM 4780	-	n.d.

IfGB: Institut für Gärungsgewerbe Berlin

BC: BioteCon Stammsammlung

SLCC: H.P.R. Seeliger Listeria Culture Collection, Würzburg

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, USA

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

GmbH, Braunschweig

n.d.: nicht durchgeführt



**Patentansprüche****1. Nukleinsäuremolekül**

- (i) der SEQ ID NO 1 5'-GAA AAA GCA TTT GAA GCC AT-3' oder
- (ii) der SEQ ID NO 2 5'-GCA ACT TCC GGC TCA GC-3' oder
- (iii) der SEQ ID NO 3 5'-TCG AAA AAG CAT TTG AAG CC-3' oder
- (iv) der SEQ ID NO 4 5'-GGT CAG AGT GAA GCT CAT GT-3' oder
- (v) der zu (i), (ii), (iii) und (iv) jeweils komplementären Sequenz.

**2. Nukleinsäuremolekül, dadurch gekennzeichnet, daß es bezüglich mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette**

- (i) mit 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der Nukleinsäuremoleküle gemäß Anspruch 1 identisch ist oder
- (ii) mit 9 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der Nukleinsäuremoleküle gemäß Anspruch 1 übereinstimmt oder
- (iii) mit 8 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der Nukleinsäuremoleküle gemäß Anspruch 1 übereinstimmt oder
- (iv) zu mindestens 90 % mit einem Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 homolog ist.

**3. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es 10 bis 250 und vorzugsweise 15 bis 30 Nukleotide lang ist.****4. Nukleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegt.****5. Nukleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es**



9.25.11.99

- (i) als DNA-Sequenz oder
- (ii) als (i) entsprechende RNA-Sequenz oder
- (iii) als PNA-Sequenz vorliegt,

wobei das Nukleinsäuremolekül gegebenenfalls in einer für analytische Nachweisverfahren, insbesondere auf Basis von Hybridisierung und/oder Amplifizierung, an sich bekannten Weise modifiziert ist.

6. Nukleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß bis zu 20 % von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette, insbesondere 1 oder 2 Nukleotide, durch für Sonden und/oder Primer an sich bekannte analoge Bausteine ersetzt sind, insbesondere durch Nukleotide, die bei Bakterien nicht natürlich vorkommen.

7. Nukleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß das Nukleinsäuremolekül dadurch oder zusätzlich dadurch modifiziert bzw. markiert ist, daß es eine oder mehrere radioaktive Gruppen, farbige Gruppen, fluoreszierende Gruppen, Gruppen zur Immobilisierung an fester Phase und/oder Gruppen für eine indirekte oder direkte Reaktion, insbesondere eine enzymatische Reaktion, insbesondere mit Hilfe von Antikörpern, Antigenen, Enzymen und/oder Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen, und/oder anderweitig modifizierende oder modifizierte Gruppen Nukleinsäure-ähnlichen Aufbaus aufweist.

8. Kit für analytische Nachweisverfahren, insbesondere zum Nachweis von Bakterien der Spezies *Listeria monocytogenes*, **gekennzeichnet** durch ein oder mehrere Nukleinsäuremoleküle gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche.

9. Verwendung eines oder mehrerer Nukleinsäuremoleküle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 oder eines Kits gemäß Anspruch 8

zum Nachweis der An- oder Abwesenheit von Bakterien der Spezies *Listeria monocytogenes*.

10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch **gekennzeichnet**, daß man eine Nukleinsäurehybridisierung und/oder eine Nukleinsäureamplifikation durchführt.

11. Verwendung nach Anspruch 10, dadurch **gekennzeichnet**, daß man eine Polymerase-Kettenreaktion für die Nukleinsäureamplifikation durchführt.

12. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch **gekennzeichnet**, daß man die nachzuweisenden Bakterien von nicht-nachzuweisenden Bakterien anhand von Unterschieden der genomischen DNA und/oder RNA an mindestens einer Nukleotidposition im Bereich eines der Nukleinsäuremoleküle gemäß Anspruch 1 unterscheidet.

**Zusammenfassung**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nukleinsäuremolekül bzw. -moleküle sowie ein Verfahren zum schnellen und sensitiven Nachweis von Bakterien der pathogenen Spezies *Listeria monocytogenes*. Ferner ist Gegenstand der Erfindung ein Testkit bzw. Testkits zur Durchführung der genannten Nachweisverfahren.